

Néhány fibrilláris protein szerkezetének elektronmikroszkópos vizsgálata

GUBA FERENC

Magyar Tudományos Akadémia Elektronmikroszkóp Laboratóriuma, Budapest

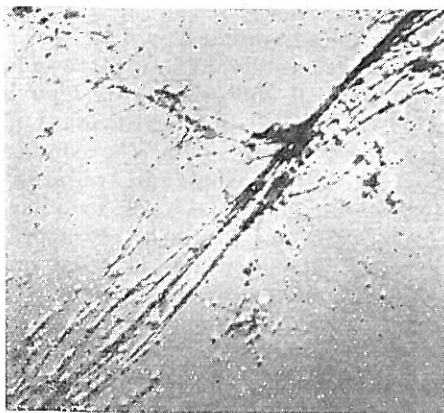
Az élő szervezetek szerkezetét, azt a strukturát, amelyen az élet jelenségei megnyilvánulnak nagy részben fibrilláris elemek építik fel. Így van ez minden sejtben és szövetben. A fibrilláris szerkezet jelentősége a kutatások sokaságának vált megindítójává. A szerkezet fibrilláris molekulái közül elsősorban a fehérjéket vették viszkozimetriás, polarizációs vizsgálatok és röntgen diffrakciós analízis tárgyává, s vizsgálták ezen fibrillák felépítését. A viszkozimetriás és a polarizált fényben való vizsgálat elsősorban a fibrilláris szerkezet léteire utal, megmutatja, hogy átmenet lehet a globuláris és fibrilláris forma között. A röntgen diffrakciós vizsgálat elsősorban az atomi elrendeződésre világít rá. Mindhárom módszer azonban alátámasztásra szorul a 150—1000 Å-s méret tartományban. Ez teszi alkalmassá az elektronmikroszkópot a fonalas fehérjék szerkezeti felépítésének tanulmányozására.

A fibrilláris szerkezeti elemeken kívül globuláris elemek is szerepelnek úgy a sejtekben, mint a szövetekben. A biokémiai kutatások kiderítették, hogy a globuláris fehérjék átalakulhatnak fibrilláris fehérjékké fiziológias körülmények között, így a globuláris aktinból fibrilláris aktin, a fibrinogénből fibrin lesz, amely folyamatosan az izomműködésben ill. a vér-alvadásban van szerepük.

Hogy az *F*-aktinban a *G*-aktin gömbszerű részecskéi gyöngyfüzérre rendeződnek az elektronmikroszkóp mutatta ki (4,5). A fibrin felépítésére vonatkozóan az elektronmikroszkóp szintén adott felvilágosítást. A fibrin foszforwolframsavval festett fonalaiban finom, kb. 200 Å-s periódusok jelennek meg (10, 8, 3, 2). Saját felvételeink kb. 100 Å vastagságú fibrillái foszforwolframsavval festve, szintén ekkora periódusokban elhelyezkedő gyöngyszemekből állnak (1. ábra).

Ez arra mutat, hogy a fibrinszálak is globuláris részek összekapcsolásából állnak.

Addig, amíg az *F*-aktin gyöngyszerű felépítése az elektronmikroszkópos képen közvetlenül látható fémárnyékolt preparátumokon (4, 5), addig a fibrin ilyen felépítődése csak ezek foszforwolframsavas kezelése után válik láthatóvá. A foszforwolfrám-, osmium-, foszformolibden-savakat az elektronmikroszkópos perspektív technika az elektronmikroszkópos vizsgálatokra már korábban is alkal-



1. ábra

Fibrinszál 1%-os foszforwolframsavval festve.
Arany árnyékolás. (40.000 × nagyítás)

mazta. Ezen vegyületek a vizsgált biológiai objektumok egyébként gyenge elektronszórását nagymértékben megnöveli és az elektronmikroszkópos képet kontrasztossá teszik. Ezzel a módszerrel sikerült egyéb rostos szövetelemek belső periódicitását megállapítani, pl. a kollagénét (9), a szem csarnokvizében levő proteinét (6), stb. Minthogy ezek az ún. elektronmikroszkópos »festékek« magas rendszámú atomokat tartalmazó savak, kézenfekvő hatásukat úgy magyarázni, hogy megkötődnek az említett fehérjék bázikus csoportjain és ezáltal teszik láthatóvá ezek belső felépítését.

Ezt az elgondolásunkat alkalmazva vizsgáltuk meg azokat a fibrilláris proteineket, melyek belső szerkezetét eddig még elektronmikroszkóppal behatóban nem tanulmányozták.

Módszer

Kísérleteinkben kristályos miozint, keratint és selyemfibroint vizsgáltunk.

A kristályos miozint Szent-Györgyi eljárása szerint preparáltuk (7). A keratin rostokhoz zsírtalanított és fagyasztó mikrotommal felaprított és mosott juh-gyapju ultrahanggal végzett besugárzása útján jutottunk. A besugárzás ideje alatt a keratinhoz KHSO_3 -t tettünk az S-S kötések redukálása céljából.

A selyem-fibroin rostokat megtisztított hernyóselyem ultrahang kezelésével nyertük.

A fehérjerostokat tartalmazó vizes szuszpenzióból mikroceppet vettünk ki és azt kolloidum hártáival bevont mikrostélyra (1) vittük. Kb. 10 perces ülepítés után a mikrostélyokat a »festő« oldatot tartalmazó edénybe helyeztük. A festés a miozinnál 10–60 percet vett igénybe. A keratint és fibroint 1–24 óráig festettük. A festés után a preparátumokat nagymennyiségű desztillált vízzel jól kimostuk, majd szárítottuk. A festést és mosást 0°C körüli hőmérsékleten végeztük.

A festékekül használt oldatok: 1%-os acetát pufferrel pH 5-re beállított foszforwolframsav; 1%-os uranilacetát; 0,01 M paraklórmerkuriibenzoát.

A fibroint a mikrostélyra preparálás előtt néhány esetben Millon-reagenssel kezeltük. Ilyenkor más »festőanyagokkal« nem festettük.

A szárított preparátumokat a kontraszt fokozására minimális mennyiségű arannyal árnyékoltuk.

A vizsgálatokat Trüb-Täuber elektronmikroszkóppal végeztük. A gyorsító feszültség 45 KV, az elektron-áramerősség 0,4–0,6 mA. Az elektronoptikai nagyítás 5–8000-szeres. A képek végleges nagyítása a képek alá írt szövegen található.

Kísérleti eredmények

Mint a bevezetésben említettük, abból a feltevésből indultunk ki, hogy a proteinek periodikus festődését a festőanyag és a festendő fehérje kémiai összetétele szabja meg. A miozinnál, a keratinnál és a fibroinnál eddig nem észleltek elektronmikroszkóppal belső strukturáltságot. Ez annak tulajdonítható, hogy nem vették figyelembe ezen fehérjék aminosav összetételét. Ezért mi a szokásos »festőanyagon«, a foszforwolframsavon kívül a kationban magas rendszámú atomot tartalmazó uranilacetátot és ugyancsak magas rendszámú atomot tartalmazó specifikus aminosav reagenst, mint a paraklórmerkuriibenzoátot és a Millon-reagenset alkalmaztuk.

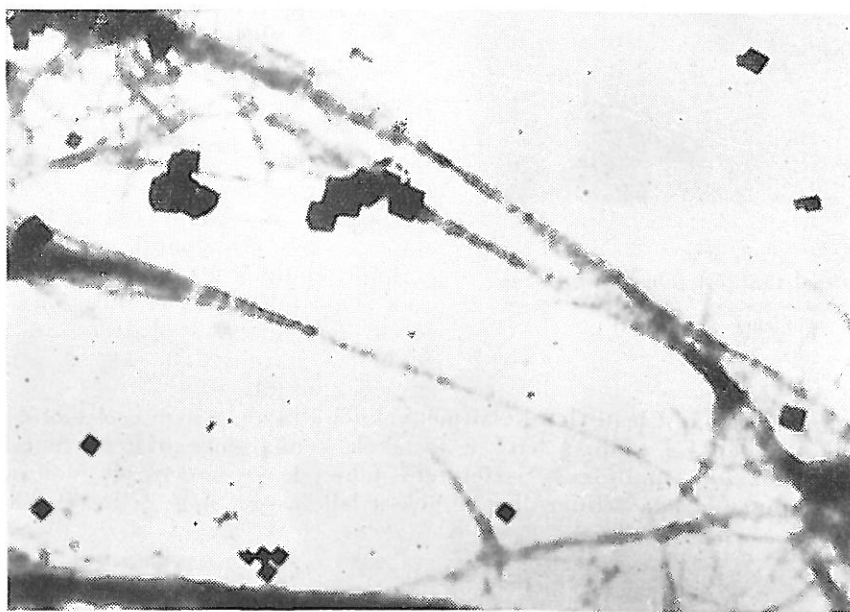
Miozin

A kristályos miozin festés és árnyékolás nélkül teljesen elmosódott körvonalú fonalakat mutat. Ha az ilyen preparátumot arannyal árnyékoljuk, rendkívül finom, 50–100 Å vékonyságú fonalakat és ezen fonalakból alkotott kötegeket látunk.

Ezen fonalakon, ill. kötegeken semmi strukturáltságot felfedezni nem sikerült. Nem találtunk strukturát akkor sem, ha a fonalakat triklórecetsavval, vagy réz sóval kezeljük. Megjelenik azonban úgy a finom fonalakon, mint kötegeken egy gyöngyszerű szerkezet, ha a preparátumot paraklormerkuribenzoáttal, vagy uranilacetáttal kezeljük (2. ábra).

A foszforwolframsavas kezelés nem teszi láthatóvá a strukturát.

A fonalak és kötegek periodicitása 100, ill. 300 Å körüli érték.



2. ábra

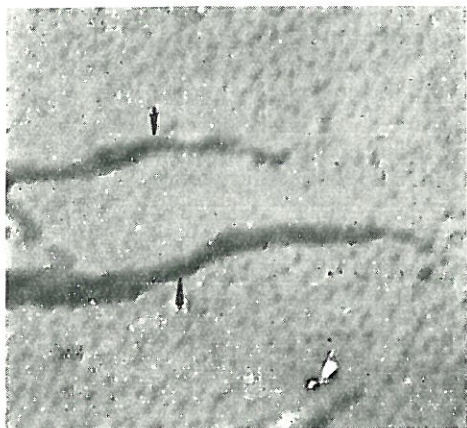
Kristályos miozin. 0,01 M paraklormerkuribenzoátos festés. Arany árnyékolás. (80.000 \times nagyítás)

Keratin

Az ultrahanggal szétrázott gyapju rostos szerkezetű Finom fonalak mellett, melyek 100—150 Å vastagok, fonalakból felépített rostok és lemezek láthatók az elektronmikroszkópban. Sem a fonalaknak, sem az összetett szerkezetű lemezeknek harántstruktúrája nem kivehető. A harántstruktúra előjön ebben az esetben is uranilacetátos, illetve paraklormerkuribenzoátos festéssel. (3. ábra). A foszforwolframsav itt sem hatásos. A periódusok távolsága úgy a paraklormerkuribenzoát, mint az uranilacetát esetén közel azonos, 120 Å érték körül mozog.

Fibroin

A fibrillaris proteinek közül a fibroin aminosav összetételét tanulmányozták leginkább. A fibroinra jellemző magas tirozin tartalma. Ennek kimutatására szolgál a Millon-próba. A hernyóselyem maga egymással összefonódott szálakból áll. A fonat egy-egy fonalának vastagsága, minthely 300 Å, rajta nem fedezhető fel



3. ábra

Ultrahanggal tisztított juhgyapjú 1%-os uranilacetátos festés. Arany árnyékolás. (60.000 × nagyítás)

A periodikusság a festetlen készítményeknél általában nem észlelhető, festési eljárással azonban jól kimutatható a festékek kémiai jellegüknek megfelelően, csak meghatározott aminosav összetételű fehérjék periodicitását mutatja ki. A festéssel kapcsolatban felmerülhet annak a lehetősége, hogy a festék hatására

periodicitás. Úgyszintén eredménytelen a többi proteinnél jól bevált bármelyik festési eljárás is. Kísérleteinkben azonban kimutattuk, hogy a selyemfibroin is mutat periodicitást, ha előzőleg Millon-reagenssel kezeljük (4. ábra). A periódusok gyöngysorszerűek és 220–240 Å távolságúak.

Kísérleti eredmények kiértékelése

A megvizsgált fibrillaris proteinek megfelelő festékekkel való kezelés után mindannyian periodikus felépítést mutatnak. Ezek a periódusok olyanok, mintha globulusok megismétlése volna. A periódusokban a miozinnál 100 Å átmérőjű alapegységek találhatók. Valószínűleg ezekből épülnek fel a miozinban ugyancsak előforduló 300 Å átmérőjű egységek. A keratin 120 Å átmérőjű egységekből, a fibroin 220–240 Å átmérőjű egységekből áll.



4. ábra

Ultrahanggal tisztított horyóselyemfibrilla Millon reagenssel kezelve. Arany árnyékolás. (40.000 × nagyítás)

műtermékek keletkeznek. Véleményünk szerint a műtermék képződés esetleg a méretek eltorzításában nyilvánulhat meg, semmiesetre sem a periodikus felépítés tényében. Ezt alátámasztják a röntgen-diffrakciós vizsgálatok, valamint azon proteinekről nyert elektronmikroszkópos képek, melyeknél a periodicitás festék nélkül is kimutatható (kollagén, aktin).

Kísérleti eredményeink arra mutatnak, hogy nem csak a ma már jól ismert kollagén, F-aktin és fibrin épült fel globuláris részekből, de más fibrilláris proteinek mint a miozin, keratin és fibroin is. Ez a megállapítás arra mutat, hogy a fibrilláris proteinek globuláris felépítése általános jelenségnek tekinthető.

(Itt mondunk köszönetet dr. Tartnóczy Tamás és dr. Szilárd János kartársainak az ultrahang besugárzások elvégzéséért.)

Összefoglalás

1. A fibrilláris proteinek közül a miozin, keratin és fibroin belső struktúráját elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

2. Festés nélkül ezen proteinek felépítésében periodicitást megállapítani nem sikerült.

3. Ezen protein fibrillákban periódikus csíkozottság jelent meg foszforsav, uranilacetát, paraklormerkuribenzoát, illetve Millon-reagenssel való kezelés hatására.

4. Vizsgálataink szerint a miozin fibrillák 100, ill. 300, a keratin fibrillák 120, a fibroin fibrillák 220—240 Å átmérőjű egységekből épülnek fel.

5. Kísérleteinkkel kapcsolatban rámutattunk a fibrillási proteinek globuláris részekből való felépítésének általános jellegére.

Érkezett : 1952. május 7.

Irodalom

1. Gerendás, M. : Természet és Technika. **61.** 53. 1952.
2. Hall, C. E. : J. Biol. Chem. **179.** 817. 1949.
3. Hawn, C. Z., & Porter, K. R. : J. Exp. Med. **86.** 285. 1947.
4. Jakus, M. A. & Hall, C. L. : J. Biol. Chem. **167.** 705. 1947.
5. Rózsa, G. et al. : Biochim. Biophys. Acta **3.** 561. 1949.
6. Schmidt, F. O. : Adv. Prot. Chem. **1.** 25. 1945.
7. Szent-Györgyi, A. : Studies on Muscle. Acta Physiol. Scand. Suppl. 9. 1945.
8. Volpers, C. : Klin. Wochschr. **24/25.** 424. 1947.
9. Volpers, C. : Makromolchem. **2.** 37. 1945.
10. Volpers, C. : Virchows Arch. **312.** 292. 1944.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ НЕКОТОРЫХ ФИБРИЛЛЯРНЫХ ПРОТЕИНОВ ПРИ ПОМОЩИ ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

Ф. Губа

Электронно-микроскопическая лаборатория АН Венгрии, Будапешт

Выводы

Исследовалась при помощи электронного микроскопа внутренняя структура следующих фибриллярных протеинов: миозин, кератин и фиброин.

Без окраски не удалось установить периодичность в структуре этих протеинов. Под действием фосфорно-вольфрамовой кислоты, уранил-ацетата, парахлор-ртути-бензоата или Миллонова реагента в этих протеиновых фибриллах появилась периодическая полосатость. По результатам исследований автора фибриллы миозина состоят из частиц диаметром 100 или 300 Å, фибриллы кератина — 120 Å, фибриллы же фиброина из частиц диаметром 220—240 Å.

Результаты исследований указывают на то, что не только в настоящее время уже хорошо известные фибриллярные протеины — коллаген, ф-актин и фибрин — состоят из глобулярных частиц, но также и другие — миозин, кератин и фиброин. Это установление указывает на то, что глобулярное строение фибриллярных протеинов можно считать общим явлением.

Рисунок 1. Нить фибрина, окрашенная 1%-ной фосфорно-вольфрамовой кислотой. Золотая тень. Увеличение в 40 тыс. раз.

Рисунок 2. Хрустальный миозин, окрашенный 0,01%-ным парахлор-ртути-бензоатом. Золотая тень. Увеличение в 80 тыс. раз.

Рисунок 3. Овчинная шерсть, очищенная при помощи ультразвука и окрашенная 1%-ным уранилацетатом. Увеличение в 40 тыс. раз.

Рисунок 4. Фибрилла натурального шелка, очищенная при помощи ультразвука и обработанная Миллоновым реагентом. Золотая тень. Увеличение в 40 тыс. раз.

Investigation of the Structure of Fibrous Proteins by Electron Microscope

F. GUBA

Electron microscope Laboratory of the Hungarian Academy of Science, Budapest

Summary

From among the fibrous proteins the inner structure of myosin, keratin and fibroin was studied by electron microscope. No periodicity could be stated in the structure of these proteins without staining. On the action of phosphotungstic acid, uranyl acetate, parachloromercuribenzoate (i. e. Millon-reagent) a periodical striation appeared in these fibrous proteins. According to our investigations the fibrils of myosin consist of units with a diameter of 100—300 Å, and the fibrils of keratin and fibroin of units with diameters of 120 and 220—240 Å, respectively.

Experimental results confirm that not only the wellknown collagen, F-actin fibrin, but other fibrous proteins, as myosin, keratin and fibroin also consist of globular particles. This observation suggests that the globular structure of fibrous proteins may be considered as a general feature.

Fig. 1. Fibrin threads stained with 1% phosphotungstic acid. Gold shadow. Enlargement: 40,000.

Fig. 2. Crystalline myosin stained with 0,01 M parachloromercuribenzoate. Gold shadow. Enlargement: 80,000.

Fig. 3. Ultra-sound treated sheep wool, stained with 1% uranyl acetate. Gold shadow. Enlargement: 40,000.

Fig. 4. Ultra-sound treated fibroin fibrils treated with Millon reagent. Gold shadow. Enlargement: 40,000.